金大医保つるま保健学会誌 Vol. 34(2)
135～139　2010

Mupid-3を用いたアガロースゲル電気泳動法による乳酸脱水素酵素アイソザイムの分離条件の検討

本間　啓子　　三田　陽子*　　藤川　千恵子*　　西谷　真希*　　馬渡　一浩

Key words
Electrophoresis, tris-HCl buffer, lactate dehydrogenase isozymes, Mupid-3, agarose gel.

はじめに

臨床検査ではセルロースアセテート膜電気泳動法が血清タンパク質や酵素のアイソザイムの分析に用いられている。そのため、検査技術科学専攻では電気泳動法の原理の理解や操作方法を習得するための実習を２年次に行っている。これまで我々は学生実習で電気泳動法を習得させるための改良法について検討し報告してきた[1-2]。これはセルロースアセテート膜の取扱いが初心者には難しく実習終了時間が遅くなっていたことを改善するための方法であり、泳動装置に超小型電気泳動システムMupid-３[3]、支持体にアガロースゲル、泳動用緩衝液にトリス塩酸緩衝液を使用したことで実習時間の大幅な短縮が実現できた。また、緩衝液に向精神薬であるバルビタールを使用せずに実習できるため、試薬の管理上の問題が解決した。Mupid-3でアガロースゲルを用いたタンパク質の電気泳動が可能であることがわかったので、同じタンパク質である酵素のアイソザイム分析も可能であると考えた。

臨床検査で分析されているアイソザイムには乳酸脱水素酵素（LD)、アルカリ性ホスファターゼ、トランスアミナーゼ、クレアチンキナーゼなどがある。このうち、LDは電気泳動によりアイソザイム分析されるものの代表である。LDアイソザイム分析法は血清を電気泳動後、酵素活性染色で可視化する方法[4-7]である。現在、LDアイソザイム分析の支持体はセルロースアセテート膜とアガロースゲルフィルムを用いる方法が主流である。前々報[1]で指摘したように、学生はマイクロピペットの操作が不慣れなので、セルロースアセテート膜に試料を塗布する際、泳動方向で塗布幅が0.3～0.5cmになったり、不均一な塗布になってしまう。この塗布幅の増大は泳動後、アイソザイムの５分画を単独で分離できず、アイソザイム同士の重なりを生ずる最大の原因となってしまう。そこでLDアイソザイムが５分画に分離できる簡便な方法の確立を目的として、アガロースゲルを用いLDアイソザイムを分析できる方法を探していたところ、長嶺[4]の方法を見出した。また、この方法の泳動用緩衝液がトリス塩酸緩衝液でバルビタール緩衝液でないことも試薬管理上の問題からも都合が良いと考えた。さらに、この方法をMupid-３を用い実習に適用する場合は以下の問題があると考えた。具体的には下記に示したが、電気泳動の条件に関するものが３点と、酵素活性染色に関するものがある。

１）支持体にアガロースだけでなくポリビニルピロリドンが含まれていることである。実習ではアガロース単独が望ましく、アガロースで支持体を作成する場合の濃度を決める必要がある。

２）トリス緩衝液の濃度が泳動用（250mmol/L）と支持体作成用（125mmol/L）が違っていることである。初心者が実験するには泳動用と支持体用どちらか一方の濃度に統一する方が都合が良い。また、緩衝液の濃度が高いほど、印加電圧が大きいほどMupid-３では泳動用緩衝液の温度上昇を引き起こし[2]、酵素を失活させてしまう恐れがある。そのため酵素活性が失活しにくい緩衝液の濃度を決める必要がある。

３）Mupid-３ではサンプルの塗布位置[3]がゲルの端から0.5cmになるのでサンプルが塗布位置より陰

金沢大学医薬保健研究域保健学系
* 金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻医療科学領域博士前期課程

極側に泳動される場合、泳動時間が長くなるとゲル外に流れ出してしまう恐れがある。そのため、適当な泳動時間の設定が必要である。

4）通常LDアイソザイム分析では酵素活性染色にトリス塩酸緩衝液が用いられているが、長嶺[4]はリン酸緩衝液の使用を推奨している。どちらの緩衝液がよいかを調べる必要がある。

そこで今回、Mupid-3でLDアイソザイムを分析する場合について、アガロースゲル濃度、泳動用緩衝液の濃度、泳動時間、さらに酵素活性染色用緩衝液を検討した結果、学生実習に導入可能なLDアイソザイムの泳動条件を確立できたので報告する。

方　　法

1．試　　料

筆者らの血液を採血し血清分離後、0.3mlずつ小分けし−20℃で保存した。これらの血清を必要に応じて解凍し、試料として用いた。

2．試　　薬

1）125mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH8.6

トリスヒドロキシルメチルアミノメタン（和光純薬、特級）の15.15gと1mol/L塩酸溶液（和光純薬特級を11.6倍希釈）25mlを蒸留水に溶解して1000mlとした。

2）250mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH8.6

トリスヒドロキシルメチルアミノメタン（和光純薬、特級）の30.29gと1mol/L塩酸溶液（和光純薬特級を11.6倍希釈）50mlを蒸留水に溶解して1000mlとした。

3）200mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH8.6

2）を希釈して用いた。

4）200mmol/L リン酸緩衝液 pH8.0

200mmol/L リン酸一カリウム溶液（27.2g/L）と200mmol/L リン酸二ナトリウム溶液（12水塩71.6g/L）を混合してpHを8.0とした。

5）0.1mol/L 乳酸リチウム溶液

96mgのL-乳酸リチウム（和光純薬）を蒸留水に溶かして10mlとした。

6）4mg/ml 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド（MTT）溶液

MTT（同仁化学）40mgを3）あるいは4）の緩衝液に溶かして10mlとし、5〜10℃で遮光保存した。

7）0.2mg/ml フェナジンメトスルフェート

フェナジンメトスルフェート（和光純薬）5mgを蒸留水に溶かして25mlとした。用時調製して遮光保存した。

8）酵素活性染色液

0.1mol/L 乳酸リチウム溶液 1.0ml、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD：オリエンタル酵母）10mg、4mg/ml MTT 0.7ml、0.2mg/ml フェナジンメトスルフェート 0.1mlに200mmol/L リン酸緩衝液 pH8.0あるいは200mmol/L トリス緩衝液pH8.6を4.0ml加え蒸留水で15mlとしたものを用いた。

3．アガロースゲルの調製

1.0%ゲルの場合はアガロースS（和光純薬）150mgを50mlのガラスビーカーに秤り、15mlのトリス塩酸緩衝液を加えた。これを電子レンジで30〜40秒加温溶解後、70℃以下になるよう2〜3分放置した。ゲルメーカー台にゲルメーカー板（小：52×60mm）を置き、コームをセット後、70℃以下に放冷したアガロースSを流し込み固化させた。

1.25%ゲルおよび1.5%ゲルの場合はアガロースSをそれぞれ188mgと225mgをビーカーに秤り、1.0%ゲルと同様にして調製した。

4．電気泳動法

電気泳動は超小型電気泳動システムMupid-3（コスモバイオ株式会社）で行った。泳動槽にトリス塩酸緩衝液を300ml入れ、同じ緩衝液で調整したアガロースゲル1枚をセットした。ヒト血清10〜20μlを各々ウェルに注入し、100Vの定電圧で30〜45分間電気泳動した。

5．LD 酵素活性染色

電気泳動が終わったゲルをトレイから外し、プラスチック容器に移し、予備加温した酵素活性染色液を加えた。容器の蓋をしてアルミホイルで遮光し37℃で40分間酵素反応を行い活性染色した。

結果と考察

1．電気泳動条件

1）アガロースゲルの濃度

125mmol/Lと250mmol/L トリス塩酸緩衝液を用いて、濃度が1.0%、1.25%、1.5%でアガロースゲルを作成し、同濃度のトリス塩酸緩衝液で電気泳動後、活性染色した。活性染色終了まで取扱い上の問題がなかったのは、1.5%アガロースゲルのみであった。1.0%、1.25%ゲルはともにゼリー強度が不十分で操作が完了できなかった。また、アガロースゲルは125mmol/Lより250mmol/L トリス塩酸緩衝液に溶解した方が脆弱であった。

これらのことから、以後の実験には125mmol/Lと

250mmol/L トリス塩酸緩衝液を用い、アガロースゲルはゲル濃度1.5%を使用することにした。

２）トリス塩酸緩衝液の濃度

125mmol/Lと250mmol/Lのトリス塩酸緩衝液を用い100Ｖで40分間通電し、通電前後の緩衝液の温度を調べた。泳動中の緩衝液の温度上昇を出来る限り抑制するために、Mupid-３本体を氷水中に置き電気泳動することにした。緩衝液の温度は泳動開始時10℃前後から、泳動終了時には、250mmol/Lで28±５℃、125mmol/Lで19±３℃まで上昇した。泳動後のアガロースゲルをLD酵素活性染色したところ、125mmol/L, 250mmol/LともにLD１～LD４は陽極側へ、LD５は陰極側に泳動された。移動距離は125mmol/Lの方が250mmol/Lより大きかった。

125mmol/L トリス塩酸緩衝液の方が電気泳動時の緩衝液の温度上昇が小さいことや酵素活性染色結果の方が濃かったことから、泳動用緩衝液は125mmol/Lトリス塩酸緩衝液を以後の実験に用いることにした。

３）電気泳動時間

適切な電気泳動時間を調べるために125mmol/Lトリス塩酸緩衝液を用いて100Ｖで30～45分間電気泳動後、酵素活性染色した。図１にアガロールゲルとセルロースアセテート膜を用い、正常血清を30分間電気泳動し酵素活性染色した結果を示す。アガロースゲルではLD１～４は陽極側へ、LD５は陰極側に泳動されたが、このうちLD４は塗布位置からわずかに陽極側であった。45分間電気泳動したものはLD５が陰極端に来る場合や、陰極側ゲル外に流れ出して検出不能となることがあったが、40分ではLD５が検出されないことはなかった。セルロースアセテート膜を対照として用いた場合はLD１～LD５のすべてのアイソザイムが塗布位置より陽極側に泳動された。また、LD１～LD５のアイソザイムの分離の程度はアガロースゲルとセルロースアセテート膜でほぼ同程度であった。

以上の結果から、アガロースゲルを用いる場合のLDアイソザイム分析には100Ｖで30～40分の通電時間が適切であると考えた。

２．酵素活性染色に用いる緩衝液の検討

正常血清を1.5%アガロースゲルを用い、125 mmol/Lトリス塩酸緩衝液で100Ｖ40分間電気泳動した。泳動終了後、ゲルを２種類の緩衝液（リン酸緩衝液とトリス塩酸緩衝液）に溶解した酵素反応液を用いて染色した。その結果を図２に示す。図２（A）は酵素活性染色の結果を図２（B）はその相対的酵素活性の結果を示す。アイソザイムパターンはリン酸緩衝液（上）を使用した方がトリス塩酸緩衝液（下）を使用した方より濃く染色されることが分かった。特にLDアイソザイムの中で割合の少ないLD４とLD５の染色性が良かった。染色の酵素反応は乳酸とＮＡＤを基質としピルビン酸を生成する反応で、至適pHは約９である。実験に用いたリン酸緩衝液のpHは8.0で、トリス塩酸緩衝液のpH8.6よりも至適pH から離れているにもかかわらず、染色性が良いことがわかった。
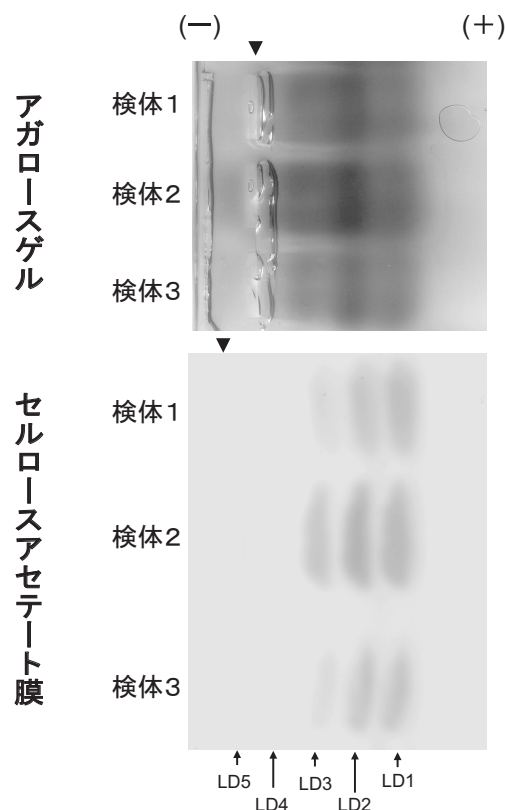
図１．正常血清のLDアイソザイム電気泳動パターン

説明：正常血清を100Vで30分電気泳動し酵素活性染色した。▼は血清塗布位置を示す。

電気泳動条件
アガロースゲル
泳動用緩衝液：125mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH8.6
酵素活性染色用緩衝液：リン酸緩衝液 pH8.0

セルロースアセテート膜
泳動用緩衝液：ベロナール緩衝液 μ=0.06
酵素活性染色用緩衝液：トリス塩酸緩衝液 pH8.6

この結果から、酵素活性染色にはリン酸緩衝液pH8.0を用いることにした。

３．アガロースゲルを用いる分析条件について

長嶺の方法[4]をMupid-３を用いて学生実習に導入するための改良法について検討した。その結果、１）1.5%のアガロースのみでゲル作成、２）泳動用
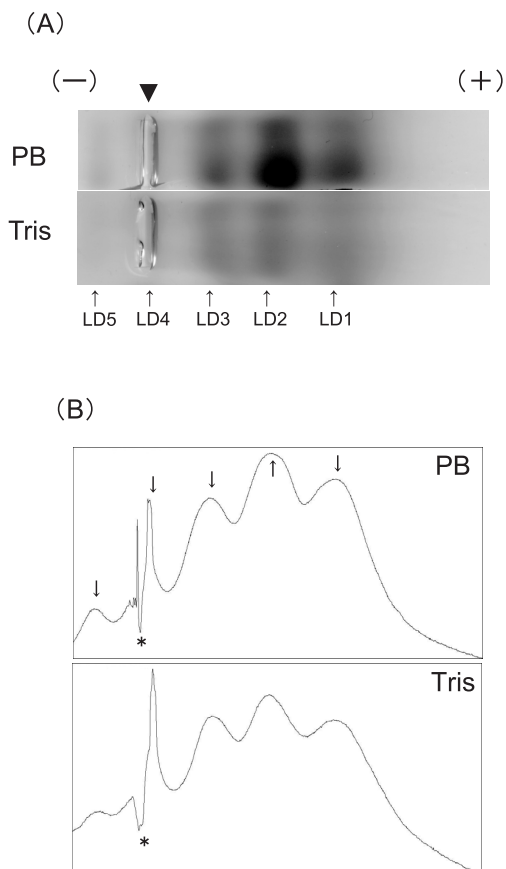
図２．緩衝液の違いによるLDアイソザイムパターン
説明
(A)：正常血清のＬＤアイソザイムパターン
PB ：酵素活性染色にリン酸緩衝液 pH8.0を用いた場合。
Tris：酵素活性染色にトリス塩酸緩衝液p H8.6を用いた場合。
▼は血清塗布位置を示す。
(B)：(A) の相対的酵素活性
左端の矢印から順番にLD5, LD4, LD3, LD2, LD1を示す。
＊は血清塗布位置。ＬＤ４はサンプル注入穴の陽極側に位置する。

緩衝液とゲルを作成するときの緩衝液を125mmol/Lのトリス塩酸緩衝液のみを使用、３）泳動中の酵素の失活を防止するために泳動槽を氷水中に静置、４）リン酸緩衝液を酵素活性染色に使用、によりセルロースアセテート膜を用いる場合とほぼ同程度に５種類のアイソエンザイムを分離し、確認できることがわかった。

この方法の長所は試料の塗布穴がアガロールゲルを作成すると同時に成型されるため、試料を塗布穴（幅約0.2cm）にマイクロピペットで入れるだけで済み、手技上の問題を生じないので学生でも再現性のあるLDアイソザイムパターンを得ることが出来る。また、欠点としては支持体であるアガロースゲルの調製が必要である点である。しかし、セルロースアセテート膜は取扱いが難しく、また試料を１×0.2cmの範囲内に均一に塗布するのは初心者には困難であることから、アガロースゲルを作成する方が簡単であると考えられる。

以上の結果から、Mupid-3でトリス塩酸緩衝液を用いてLDアイソザイムを実習で分析する場合の条件は以下のとおりである。

泳動用緩衝液	：125mmol/Lトリス塩酸緩衝液 pH8.6
ゲル濃度	：1.5％アガロースＳ
試料の塗布位置	：陰極より0.5cm
通電条件	：100Vで30～40分間 ただし、泳動槽は氷水中に静置
酵素活性染色	：リン酸緩衝液で遮光下、37℃で40分間

文　献

1）本間啓子，永島幹子，櫻井裕之，他：Mupid-3を用いたアガロース電気泳動法によるタンパク質の分離条件の検討，金大医保つるま保健学会誌 31(2)：81-83，2007
2）本間啓子，永島幹子，三田陽子，他：トリス塩酸緩衝液を用いたアガロース電気泳動法によるタンパク質の分離条件の検討，金大医保つるま保健学会誌32(2)：49-51，2008
3）超小型電気泳動システム　Mupid-3取扱説明書，コスモバイオ株式会社
4）長嶺光隆：乳酸脱水素酵素（LDH）アイソエンザイムの測定法に関する研究（第１報），臨床病理，19：627-632，1971
5）金井正光編：臨床検査法提要　改訂第28版，金原出版，pp Ⅶ130-Ⅶ132，1978
6）中山年正：最新電気泳動実験法，医歯薬出版，pp281-289，1999
7）梅田敬子，金村茂：寒天ゲル電気泳動法，Medical Technology，7：pp1169-1173，1979